

PROCESS FOR PREPARING PURIFIED NUCLEIC ACID AND THE USE THEREOF

Patent Number: WO9729113
Publication date: 1997-08-14
Inventor(s): KUHNE WOLFGANG (DE)
Applicant(s): KUHNE WOLFGANG (DE); BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)
Requested Patent: ☐ WO9729113
Application Number: WO1997EP00321 19970124
Priority Number(s): EP19960101628 19960206
IPC Classification: C07H1/08; A61K48/00; C12N15/10
EC Classification: C12N15/10A2B
Equivalents: AU1444997, CA2245576, CN1210541, DE59709915D, JP11509554T
Cited Documents: WO9521250; EP0268946; WO9521177; WO9521179

Abstract

The invention relates to a nucleic acid preparation with a content of below 1 % protein, preferably below 0.1 % protein, free of ethidium bromide, phenol, caesium chloride and detergents based on octyl phenol poly (ethylene glycol ether)n and with a content of below 1 EU/mg DNA of endotoxins. Said preparation is suitable as a drug particularly in gene therapy.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07H 1/08, A61K 48/00, C12N 15/10	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/29113 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. August 1997 (14.08.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00321 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Januar 1997 (24.01.97) (30) Prioritätsdaten: 96101628.4 6. Februar 1996 (06.02.96) EP (34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw. (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE/DE); Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KUHNE, Wolfgang [DE/DE]; Wolfbauerweg 10, D-82377 Penzberg (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Werk Penzberg, Patentabteilung (RE-TB), Postfach 11 52, D-82372 Penzberg (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: PROCESS FOR PREPARING PURIFIED NUCLEIC ACID AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON GEREINIGTER NUKLEINSÄURE UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention relates to a nucleic acid preparation with a content of below 1 % protein, preferably below 0.1 % protein, free of ethidium bromide, phenol, caesium chloride and detergents based on octyl phenol poly(ethylene glycol ether)_n and with a content of below 1 EU/mg DNA of endotoxins. Said preparation is suitable as a drug particularly in gene therapy.

(57) Zusammenfassung

Eine Nukleinsäurepräparation mit einem Gehalt von weniger als 1 % Protein, vorzugsweise weniger als 0,1 % Protein, frei von Ethidumbromid, Phenol, Cäsiumchlorid und Detergentien auf Basis von Octylphenolpoly(ethylenglycolether)_n sowie mit einem Gehalt von weniger als 1 EU/mg DNA an Endotoxinen ist als Arzneimittel insbesondere in der Gentherapie geeignet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren zur Herstellung von gereinigter Nukleinsäure und deren Verwendung

Die Erfindung betrifft die Herstellung von gereinigter Nukleinsäure und deren Verwendung, insbesondere in der Gentherapie.

Die Herstellung von replizierbarer Nukleinsäure erfolgt üblicherweise durch Vermehrung von replikationsfähiger Plasmid-DNA in gramnegativen Bakterien, wie z.B. *E. coli*. Nach Aufschluß der Biomasse (üblicherweise alkalische Lyse, mit Lysozym oder Ultraschall) wird abzentrifugiert und der Überstand mit Phenol ausgeschüttelt. Anschließend wird an einem Cäsiumchloridgradienten eine Ultrazentrifugation durchgeführt. (Birnboim & Doly, *Nucleic Acid Res.* 7 (1979) 1513 - 1523, Garger et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 117 (1983) 835 - 842.). Derartige Präparationen enthalten jedoch Endotoxine, Phenol, Cäsiumchlorid und/oder Ethidiumbromid als Anfärbemittel.

Ein weiteres Verfahren ist im QIAGEN® Plasmid Handbook (Qiagen Inc., Chatsworth, USA) und der EP-B 0 268 946 beschrieben. Danach wird das nach üblichem Aufschluß gewonnene Zellysate an QIAGEN®-TIP, welches QIAGEN® resin (ein Trägermaterial auf Silicagelbasis) enthält, chromatographiert. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, daß DNA-Bindeproteine nicht vollständig von der DNA abgelöst werden und deshalb die gereinigte Plasmidfraktion Proteine und insbesondere Endotoxine (aus der Membran der gramnegativen Wirtszellen) in beträchtlichem Umfang enthält.

In einem weiteren Verfahren wird nach alkalischer Lyse der *E. coli*-Biomasse nach Birnboim & Doly eine Chromatographie des Zentrifugationsüberstandes unter Hochsalzbedingungen über Anionentauschersäulen (z. B. Mono-Q, Source-Q von Pharmacia, Macroprep-Q von BioRad, Poros-Q von Perseptive Biosystems oder HyperD-Q von Biosepra, vgl. Chandra et al., *Analyt. Biochem.* 203 (1992) 169 - 172; Dion et al., *J. Chrom.* 535 (1990) 127 - 147) durchgeführt. Auch hier enthält die gereinigte Plasmidfraktion Proteine und insbesondere in beträchtlichem Umfang Endotoxine.

In einem weiteren Verfahren ist nach alkalischer Lyse und anschließender Phenol/Chloroformextraktion eine Chromatographie über Gelfiltration möglich (McClung &

Gonzales, *Analyt. Biochem.* 177 (1989) 378 - 382; Raymond et al., *Analyt. Biochem.* 173 (1988) 125 - 133). Auch nach dieser Reinigung enthält die Plasmidpräparation Verunreinigungen, insbesondere Phenol.

In der WO 95/21177 wird ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren für den Einsatz in der Gentherapie beschrieben, wobei die Reinigung im wesentlichen durch Zentrifugieren, Filtrieren, eine Affinitätschromatographie oder eine Chromatographie an einem anorganischen Chromatographiematerial, mit anschließender Chromatographie an einem Ionenaustauscher, erfolgt. Eine weitere Abreicherung von Endotoxinen kann nach der WO 95/21177 dann erreicht werden, wenn im Reinigungsprozeß die Nukleinsäure mit einem "Endotoxin Removal Buffer", der 10 % Triton® X 100 und 40 mmol/l MOPS-Puffer (3-Morpholino-1-propansulfonat-puffer) enthält, behandelt wird. Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß die auf diese Weise gereinigte Nukleinsäure Verunreinigungen an Triton® und MOPS-Puffer enthält. Durch dieses Verfahren kann zwar eine Abreicherung von Endotoxinen auf einen Gehalt von ca. 100 EU/mg DNA erreicht werden (Qiagen News 1/96, 3 - 5), eine weitergehende Entfernung von Endotoxinen ist jedoch durch dieses Verfahren nicht möglich.

Für eine therapeutische Anwendung, wie sie beispielsweise für die Gentherapie vorgesehen ist, wird jedoch eine Nukleinsäurepräparation benötigt, die möglichst frei von allen Verunreinigungen (insbesondere weitestgehend frei von Endotoxinen) ist. Vor allem der Endotoxingehalt von Plasmidpräparationen stellt bisher ein nicht gelöstes Problem dar, wie beispielsweise von Cotten et al., *Gene Therapy* 1 (1994) 239 - 246 beschrieben wurde. Ein verminderter Endotoxingehalt (ca. 100 EU/mg DNA) kann nach dem Stand der Technik, wie beispielsweise gemäß der WO 95/21177, nur dann erreicht werden, wenn die Nukleinsäuren mit nichtionischen Detergentien, wie z. B. Triton (Endotoxin Removal Buffer aus WO 95/21177), behandelt werden. Triton® hat jedoch eine biologische Wirkung, wie z. B. Lungenveränderungen oder Senkung des Blutdrucks (Fiedler, *Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie und Kosmetik und angrenzende Gebiete* (Band 9, 3. Auflage, 1989, Editio Cantor, DE)). Der zusätzlich erforderliche MOPS-Puffer enthält ebenfalls, aus Sicht einer therapeutischen Anwendung, eine problematische Substanz.

Durch die Erfindung wird eine Nukleinsäurepräparation, vorzugsweise eine Plasmid-DNA von hoher Reinheit, in der die Endotoxine weitgehend abgereichert sind, vorzugsweise ohne Ethidiumbromid, Phenol, Cäsiumchlorid, Polymyxin oder nichtionischen Detergentien sowie ein

einfaches und effektives Verfahren zur Reinigung von solchen Nukleinsäuren, insbesondere zur Abreicherung von Endotoxinen bereitgestellt.

Gegenstand der Erfindung ist eine in gramnegativen Bakterien replizierbare Nukleinsäure, vorzugsweise eine Plasmid-DNA mit einem Gehalt von weniger als 1% Protein, vorzugsweise weniger als 0,1 % Protein und einem Gehalt von weniger als 1 EU/mg DNA, bevorzugt 0,01 - 0,1 EU/mg DNA an Endotoxinen. Vorzugsweise ist diese Plasmid-DNA frei von Ethidiumbromid, Phenol und Cäsiumchlorid, frei von Detergenzien auf Basis von Octylphenol-poly(ethylenglycolether)_n, wie z.B. Triton®-Detergenzien, ebenso frei von MOPS-Puffersubstanz und von RNase.

Unter Amplifikation ist die Erhöhung der Kopienzahl einer Nukleinsäure (insbesondere DNA und Plasmid-DNA), basierend auf der Replikation eines Vektors zu verstehen. Dabei werden von einem template eine Vielzahl von Kopien hergestellt. Repliziert wird ein Vektor, welcher die Nukleinsäure darstellt, oder welcher die Nukleinsäure kloniert enthält.

Unter einer Plasmid-DNA ist ein extrachromosomales DNA-Duplex-Molekül zu verstehen. Die Größe eines DNA-Plasmids beträgt üblicherweise 1 bis mehr als 200 kb und liegt in Wirtszellen in einer bis mehreren Hunderten von Kopien vor. Plasmid-DNA wird üblicherweise in gramnegativen Bakterien, wie z. B. E.coli, amplifiziert und anschließend isoliert. Plasmide werden häufig verwendet zur Konstruktion von Klonierungsvektoren, zur Transfektion von prokaryontischen und eukaryontischen Zellen. Eine therapeutische Verwendung ist insbesondere im Zusammenhang mit der in vivo- und ex vivo-Gentherapie von Bedeutung. Therapeutisch verwendete Plasmid-DNA hat vorzugsweise eine Länge von 5 bis 20 kb, besonders bevorzugt 5 - 10 kb, und ist doppelsträngig. Die Plasmid-DNA kann linearisiert oder zirkulär geschlossen sein. Vorzugsweise wird im wesentlichen zirkulär geschlossene DNA verwendet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist demzufolge eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, vorzugsweise Plasmid-DNA, in einer therapeutisch wirksamen Menge und gegebenenfalls zusätzlich pharmazeutische Hilfs-, Füll- oder Zusatzstoffe.

Endotoxine sind Lipopolysaccharide aus gramnegativen Bakterien. Endotoxine können in Säugern als Pyrogene wirken und einen Endotoxinschock induzieren. Die wesentliche toxische Komponente der Endotoxine ist Lipid A, wobei der Polysaccharidteil die Wasserlöslichkeit

vermittelt und der Lipidteil toxisch wirkt. Der biologische Effekt von Endotoxinen in Säugern sind insbesondere eine Hypersensibilisierung sowie andere Reaktionen, die durch Fieber begleitet sind.

Plasmid-DNA wird gemäß den Standardverfahren in *E.coli*, also einem gramnegativen Bakterium, amplifiziert. Nach der Fermentation wird die dabei erhaltene Biomasse aufgeschlossen und die Zellen lysiert. Hierbei werden aus der Zellmembran die Endotoxine freigesetzt. Dies bedeutet, daß nach der Amplifikation von Nukleinsäuren, insbesondere von Plasmid-DNA, in gramnegativen Bakterien und insbesondere in *E.coli* eine Abreicherung von Endotoxinen erforderlich ist, wenn diese Plasmid-DNA therapeutisch verwendet werden soll.

Für eine therapeutische Anwendung von replizierbaren Nukleinsäuren, insbesondere Plasmid-DNA, werden, je nach Anwendung, Dosen von 50 µg bis 10 mg und mehr verwendet bzw. geplant. Die Dosismenge hängt von der Erkrankung und Applikationsart ab. Im Aerosol, z. B. zur Behandlung der cystischen Fibrose, werden Dosen von 400 µg und mehr verwendet. Analoges gilt für im Lipidkomplex (z. B. in Liposomen) verkapselte Plasmid-DNA. Um derartige Mengen von therapeutisch einsetzbarer replizierbarer Nukleinsäure zur Verfügung zu stellen, ist es erforderlich, die replizierbare Nukleinsäure in großem Maßstab herzustellen. Hierfür sind Fermentationsansätze mit 1 - 5 kg Biomasse, woraus 1 - 5 g Nukleinsäure isoliert werden können, zweckmäßig.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung einer Plasmid-DNA mit einem Gehalt von weniger als 1 EU/mg DNA, bevorzugt 0,01 - 0,1 EU/mg DNA an Endotoxinen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß Plasmid-DNA in gramnegativen Bakterien wie *E.coli* vermehrt wird, die Biomasse aufgeschlossen und die löslichen Bestandteile an Hydroxylapatit chromatographiert werden und anschließend die genannte Plasmid-DNA isoliert wird. Vorzugsweise wird vor der Chromatographie an Hydroxylapatit eine Anionentauscherchromatographie durchgeführt, mit der im wesentlichen RNA und Fremdproteine entfernt werden. Dadurch können gegebenenfalls weitere Verunreinigungen beseitigt werden und ein Gehalt der Nukleinsäure von weniger als 1 % Protein, vorzugsweise weniger als 0,1 % Protein, frei von Ethidiumbromid, Phenol und Cäsiumchlorid erreicht werden. Eine solche Präparation ist vorzugsweise auch frei von Detergentien auf Basis von Octylphenol-poly(ethylenglycolether)_n und MOPS-Puffersubstanz.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren gelingt es, eine Vielzahl von Verunreinigungen zu vermeiden oder zu beseitigen, die Plasmid-DNA enthält, wenn sie nach einem dem Fachmann

geläufigen Verfahren hergestellt wird. Vor allem gelingt es überraschenderweise auf einfache Weise, den Endotoxingehalt drastisch zu vermindern.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird durch die Chromatographie mit Hydroxylapatit eine überragende Abreicherung von Endotoxinen erreicht. Dies ist um so überraschender, da die Chromatographie an Hydroxylapatit in der Literatur lediglich zur Trennung von DNA und RNA eingesetzt wird (Johnson & Ilan, *Analyt. Biochem.* 132 (1983) 20 - 25).

Die chromatographische Wirkung von Hydroxylapatit beruht im wesentlichen auf der Wechselwirkung zwischen Calcium²⁺-Gruppen und der negativen Ladung der zu reinigenden Nukleinsäure und in geringerem Umfang durch die Wechselwirkung der zu reinigenden Nukleinsäure mit PO₄³⁻-Gruppen an der Oberfläche von kristallinem Hydroxylapatit (vgl. z. B. *Protein Purification Methods*, Ed. by Elv. Harries and S. Angal, Oxford University Press 1989, 238 - 244). Im wesentlichen kann die Chromatographie an Hydroxylapatit für Nukleinsäuren als Anionenaustauscherschritt bezeichnet werden, wobei die gebundene DNA nicht durch einfache Erhöhung der Ionenstärke (z. B. NaCl) sondern durch Erhöhung der Konzentration, vorzugsweise an Phosphat oder Citrat, zweiwertigen Metallionen und/oder EDTA, von der Hydroxylapatit-Matrix eluiert werden kann.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden bei der Chromatographie an Hydroxylapatit (z. B. HA-Ceramic, Bio-Gel HPHT, Bio-Gel HT/HTP von Biorad DE, HA-Ultrogel von IBF oder HA spheroidal von BDH, Macrosorb C von Sterling Organics) zunächst Endotoxine und die zu reinigende Nukleinsäure im wesentlichen über Dipol-Dipol Wechselwirkungen an Hydroxylapatit gebunden. Die Äquilibrierung erfolgt üblicherweise bei neutralem pH in Phosphatpuffer. Vorzugsweise wird, wie beim anschließenden Waschen der Säule, ein Denaturierungsmittel zugegeben. Überraschenderweise gelingt es mit Phosphat-, Citrat- oder Calciumionen, die Nukleinsäure aus ihrer Bindung an Hydroxylapatit zu verdrängen, während die Endotoxine gebunden bleiben. Die Verdrängung der Nukleinsäure aus ihrer Bindung an Hydroxylapatit kann, statt durch Calciumionen, auch durch andere zweiwertige Metallionen, die in Apatit Calcium ersetzen können, wie z. B. Mg, Fe, Mn, durchgeführt werden. Zur Elution beträgt die Ionenkonzentration vorzugsweise 100 mmol/l oder mehr. Besonders bevorzugt sind Ionenkonzentrationen zwischen 100 und 500 mmol/l bzw. 200 und 500 mmol/l. Besonders bevorzugt wird eine phosphationenhaltige Lösung (z. B. Phosphatpuffer) verwendet. Vor der Elution (ohne Denaturierungsmittel) wird zweckmäßig (mit Denaturierungsmittel) gewaschen. Es hat sich als vorteilhaft gezeigt, wenn z. B. eine Phosphat- oder Sulfatlösung (100 - 200 mmol/l) verwendet wird, der ein Denaturierungsmittel

(z. B. Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid) in einer DNA-denaturierenden Konzentration (z. B. 6 mol/l Harnstoff) zugegeben wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird zusätzlich noch eine Ultrafiltration nach der Chromatographie an Hydroxylapatit durchgeführt.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure werden die Plasmide, welche die Nukleinsäure darstellen oder enthalten, üblicherweise in gramnegativen Bakterienkulturen amplifiziert. Derartige Methoden sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise von J. Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press und von F.M. Ausubel et al. eds. (1991), *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York beschrieben. Dazu werden die Bakterienkulturen, welche die Plasmide enthalten, zunächst subkultiviert und anschließend in einem geeigneten Medium, gegebenenfalls unter Zusatz eines Selektionsmittels kultiviert.

Der Aufschluß der Biomasse erfolgt ebenfalls nach dem Fachmann geläufigen Methoden (mechanischer oder enzymatischer Aufschluß, siehe z.B. Birnboim und Doly, *Nucleic Acids Research* 7 (1979) 1513-1523), ohne RNase-Zugabe. Auf eine Phenolausschüttelung kann verzichtet werden, wenn die Proteinabtrennung durch die Chromatographie an einem Anionentauscher erfolgt. Nach Aufschluß und Abtrennung der unlöslichen Bestandteile, zweckmäßig durch Zentrifugation und Filtration über eine Filterkerze (5 µm Poren), wird der Zellüberstand vorzugsweise zur Entfernung von Proteinen zunächst an einem Anionentauscher chromatographiert. Als Anionentauscher geeignet sind Anionentauscher auf Agarosebasis, wie beispielsweise Q-Sepharose. Weitere geeignete Anionenaustauscher basieren auf Polymetacrylat (Macroprep/Bio-Rad, Deutschland), Polystyrol/Divinylbenzol (Poros/Perseptive, HyperD/Biosepra, Source/Pharmacia) oder Silicagel, an dessen Oberfläche z. B. Diethylaminoethyl (DEAE) oder Dimethylaminoethyl(DMAE)-gruppen gebunden sind.

Um den Reinigungseffekt zu optimieren, wird die Nukleinsäure mittels Hochsalzgradient, z. B. NaCl-Gradient (vorzugsweise 0,65 mol/l - 0,85 mol/l) in TE-Puffer eluiert. Dadurch wird überraschenderweise eine Abtrennung einer Vielzahl von Verunreinigungen (RNA, Protein) in einem Schritt möglich.

Ebenso bevorzugt ist es, noch zusätzlich, vorzugsweise nach der Hydroxylapatitchromatographie, eine Isopropanol-/Ethanol-fällung zur Minimierung der Keimbelastung sowie zur Ent-

salzung durchzuführen. Anschließend kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure steril abgefüllt werden.

Die nachfolgenden Beispiele beschreiben die Erfindung weiter:

Beispiel 1

Gewinnung von Nukleinsäure aus E.coli-Biomasse

Plasmid-DNA enthaltende E.coli-Biomasse wird durch eine Alkali-Lyse aufgeschlossen und die freigesetzte Plasmid-DNA über Q-Sepharose und HA-Ceramic chromatographiert. Das Eluat wird durch eine Isopropanol/Ethanol-Fällung entsalzt und konzentriert und der Plasmid-DNA-Niederschlag in TE-Puffer resuspendiert.

Resuspensionspuffer: 50 mmol/l Tris/HCl, 10 mmol/EDTA-Na₂, pH 8,0 ± 0,2

Kaliumacetatpuffer: 3 mol/l Kaliumacetatpuffer pH 5,5

60 g Biomasse (feucht, E.coli) wird aus dem Fermenter in entpyrogenisierte Zentrifugenbecher abgefüllt. Es werden 750 ml Resuspensionspuffer zugegeben und mindestens 24 Stunden bei 5 ± 4°C langsam (ca. 35 RPM) gerührt, bis die Biomasse vollständig suspendiert ist. Dabei wird die Temperatur der Suspension langsam auf 25°C erhöht.

Zur Suspension werden 750 ml 0,2 mol/l NaOH/1 % SDS unter Rühren mit ca. 80 RPM zugegeben und bei 25°C 5 Minuten inkubiert. Es werden 750 ml Kaliumacetatpuffer (s. o.) unter Rühren zugefügt und die Temperatur der Biomasse möglichst schnell auf 4°C abgesenkt.

Die Biomasse wird für 30 Minuten bei 26000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wird dekantiert und über eine 5 µm-Filterkerze klarfiltriert.

Chromatographie an Q-Sepharose ff:

TE-Puffer: 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA pH 8,0 ± 0,2

Äquilibrier/Waschpuffer = Gradientenpuffer A: 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,65 mol/l NaCl pH 8,0 ± 2.

Gradientenpuffer B: 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,85 mol/l NaCl pH $8,0 \pm 0,2$.

Der dekantierte Zentrifugenüberstand wird durch Zugabe von ca. 350 ml TE-Puffer/l Zentrifugationsüberstand auf 49 - 50 mS/cm Leitfähigkeit eingestellt und auf $5^\circ \pm 4^\circ\text{C}$ abgekühlt. Die gesamte Chromatographie wird bei dieser Temperatur durchgeführt. Der Zentrifugationsüberstand wird bei 5 - 8 Säulenvolumen (SV)/Std. auf die äquilibrierte Säule aufgezogen. Anschließend wird die Säule bei einer Flußrate von 5 - 8 SV/Std. mit ca. 8 SV 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,65 mol/l NaCl pH $8,0 \pm 0,2$ gewaschen.

Elution

An die Säule wird ein Gradient (5 SV Puffer A, 5 SV Puffer B) angelegt und das Eluat bei einer Flußrate von 5 - 8 SV/Std. fraktioniert. Die Detektion erfolgt bei 254 nm. Der Vorpeak (Verunreinigungen) wird vom Hauptpeak (Plasmid-DNA) abgetrennt, indem der Hauptpeak ab ansteigender Flanke in einem separaten Gefäß aufgefangen wird. Der Endotoxingehalt des Eluats beträgt zwischen 1200 und 12000 EU/mg Plasmid-DNA.

Chromatographie an Hydroxylapatit (HA Ceramic)

Die Chromatographie wird bei $5 \pm 4^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Äquilibrierungspuffer: 0,1 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH $7,0 \pm 0,2$

Waschpuffer 1: 0,15 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH $7,0 \pm 0,2$

Waschpuffer 2: 0,02 mol/l Kaliumphosphat-Puffer pH $7,0 \pm 0,2$

Elutionspuffer: 0,5 mol/l Kaliumphosphat pH $7,0 \pm 0,2$

Die Detektion erfolgt bei 254 nm mit einer UV-Detektor/Schreibereinheit. Als Eichlösung wird eine 1 % Produktlösung (Plasmid DNA), vermessen mit einem kalibrierten Photometer, verwendet.

Der Q-Sepharose®-Pool wird auf eine Endkonzentration von 1,1 mmol/l Calciumchlorid gebracht und bei einer Flußrate von 5 - 8 SV/Std. auf die äquilibrierte Säule aufgezogen.

Anschließend wird die Säule bei einer Flußrate von 5 - 8 SV/Std. nacheinander gewaschen mit:

1. 0,1 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH $7,0 \pm 0,2$, bis am Detektor keine Absorption mehr erkennbar ist.
2. 2 - 4 SV, 0,15 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH $7,0 \pm 0,2$
3. 5 SV, 0,02 mol/l Kaliumphosphat pH $7,0 \pm 0,2$

Im Anschluß an die Waschschrirte wird mit 0,5 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH $7,0 \pm 0,1$ bei einer Flußrate von 5 - 6 SV/Std. eluiert.

Der Peak wird gesammelt, auf 25°C temperiert und mit 10 % seines Volumens an 4 mol/l KCl-Lösung aufgestockt. Anschließend wird mit 0,7 Vol.-Anteil (bezogen auf das Volumen des Eluats) an Isopropanol versetzt, die Lösungen gemischt und für 5 - 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Es wird für 30 Minuten bei $\geq 20000 \text{ xg}$ zentrifugiert, wobei sich die Plasmid-DNA im Niederschlag befindet.

Der Niederschlag wird mit 20 ml 70 %igem Ethanol versetzt und für 10 - 15 Minuten bei $\geq 20000 \text{ xg}$ bei 4°C erneut abzentrifugiert.

Der Niederschlag, welcher die Plasmid-DNA enthält, wird in TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA pH $8,0 \pm 0,2$) resuspendiert und eine Plasmidkonzentration von 1 mg/ml wird eingestellt. Der Endotoxingehalt liegt typischerweise bei weniger als 0,06 EU/mg DNA und zwischen 0,01 und 0,06 EU/mg DNA.

Die Bestimmung des Endotoxingehalts erfolgt durch Zugabe der zu untersuchenden Lösung zu einer Limulus-Amöbozyten-Lysat-Lösung (LAL-Lösung). Endotoxine führen zu einer Gelbildung in diesem Gemisch.

In den Negativkontrollansätzen darf es zu keiner Gelbildung kommen, und in den Positivkontrollansätzen sowie in den Probelösungen, aufgestockt mit zwei λ -Kontrollstandard-Endotoxin, muß es zu einer Gelbildung kommen.

Die erste Verdünnungsstufe der Wirkstofflösung, für die diese Kriterien zutreffen und bei der es zu keiner Gelbildung kommt, wird zur Berechnung des Endotoxingehalts der Wirkstofflösung nachfolgende Formel eingesetzt:

$$E = V \times \lambda \text{ (EE/ml)}$$

E: Endotoxingehalt

V: Verdünnungsfaktor

λ : Lysatempfindlichkeit (EE/ml)

Beispiel 2

Plasmidpräparation nach dem Stand der Technik

Die Plasmidpräparation erfolgt analog Birnboim et al., Nucl. Acids Res. 7 (1979) 1513-1523 und Meth. Enzymol. 100 (1983) 243-255. Danach werden die Bakterienzellen in NaOH/SDS, in Gegenwart von RNase, lysiert. Es wird zentrifugiert und der Überstand, welcher die Plasmid-DNA enthält, weiterverarbeitet. Der Überstand wird auf eine voräquilibrierte Qiagen®-Säule geladen.

Die Bakterienmasse wird in 4 ml Puffer (100 µg/ml RNase A, 50 mmol/l Tris-HCl, 10 mmol/l EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Es werden 4 ml Lysepuffer (200 mmol/l NaOH, 1 % SDS) zugegeben und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Anschließend werden 4 ml Neutralisationspuffer (3 mol/l Kaliumacetat, pH 5,5) zugegeben und bei 4°C für 15 Minuten inkubiert. Bei der gleichen Temperatur wird 30 Minuten bei 30000 xg zentrifugiert und der Überstand weiterverarbeitet. Eine Qiagen®-Säule wird mit 4 ml Äquilibrationpuffer (750 mmol/l NaCl, 50 mmol/l MOPS, 15 % Ethanol, pH 7,0, 0,15 % Triton®X 100) äquilibriert und der Überstand auf die Säule gegeben. Es wird mit 1 mol/l NaCl, 50 mmol/l MOPS, 15 % Ethanol, pH 7,0 gewaschen und mit 5 ml Elutionspuffer (1,25 mol/l NaCl, 50 mmol/l Tris-HCl, 15 % Ethanol, pH 8,5) eluiert.

Das Eluat wird mit Isopropanol (0,7 Vol.) präzipitiert und bei 15000 xg bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird in 70 % Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8,0 resolubilisiert.

Der Endotoxingehalt einer solchen Plasmidpräparation beträgt typischerweise 300 - 3000 EU/mg. Unter Verwendung eines "Endotoxin Removal Buffers" gemäß WO 95/21177 und Qiagen News 1/96, S. 3 - 5 kann der Endotoxingehalt noch auf ca. 100 EU/mg gesenkt werden.

Referenzliste

- Ausubel, F.M., et al. eds. (1991), Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York
- Birnboim, H.C. und Doly, J., Nucleic Acids Research 7 (1979) 1513-1523
- Birnboim, H.C., et al., Meth. Enzymol. 100 (1983) 243-255
- Chandra et al., Analyt. Biochem. 203 (1992) 169-172
- Cotten et al., Gene Therapy 1 (1994) 239-246
- Dion et al., J. Chrom. 535 (1990) 127-147
- Europäisches Patent EP-B 0 268 946
- Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie und Kosmetik und angrenzende Gebiete (Band 9, 3. Auflage, 1989, Editio Cantor, DE)
- Garger et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 117 (1983) 835-842
- Johnson & Ilan, Analyt. Biochem. 132 (1983) 20-25
- McClung & Gonzales, Analyt. Biochem. 177 (1989) 378-382
- Protein Purification Methods, Ed. by Elv. Harries and S. Angal, Oxford University Press 1989, 238-244.
- QIAGEN NEWS 1/96, 3-5
- QIAGEN Plasmid Handbook (Qiagen Inc., Chatsworth, USA)
- Raymond et al., Analyt. Biochem. 173 (1988) 125-133
- Sambrook, J., et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
- WO 95/21177

Patentansprüche

1. Nukleinsäurepräparation mit einem Gehalt von weniger als 0,1 % Protein sowie mit einem Gehalt von weniger als 1 EU/mg DNA an Endotoxinen.
2. Nukleinsäurepräparation nach Anspruch 1 mit einem Gehalt von 0,01 bis 0,1 EU/mg DNA an Endotoxinen.
3. Nukleinsäurepräparation nach Anspruch 1 oder 2, frei von Ethidiumbromid, Phenol, Cäsiumchlorid MOPS-Puffersubstanz und Detergenzien auf Basis von Octylphenol-poly(ethylenglycolether)_n.
4. Nukleinsäurepräparation nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in gramnegativen Bakterien replizierbar ist.
5. Nukleinsäurepräparation nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine Plasmid-DNA ist.
6. Plasmid-DNA nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmid-DNA replikationsfähig ist.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine replizierbare Nukleinsäure mit einem Gehalt von weniger als 0,1 % Protein sowie mit einem Gehalt von weniger als 1 EU/mg DNA an Endotoxinen in einer therapeutisch wirksamen Menge und gegebenenfalls pharmazeutische Hilfs-, Füll- oder Zusatzstoffe.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, gekennzeichnet durch einen Gehalt von 0,01 bis 0,1 EU/mg DNA an Endotoxinen.
9. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure mit einem Gehalt von weniger als 1 EU/mg an Endotoxinen, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in gramnegativen Bakterien repliziert wird, die Biomasse aufgeschlossen und die löslichen Bestandteile an Hydroxylapatit chromatographiert werden und die genannte Nukleinsäure isoliert wird.

10. Verwendung einer replizierbaren Nukleinsäure mit einem Gehalt von weniger als 0,1 % Protein sowie mit einem Gehalt von weniger als 1 EU/mg an Endotoxinen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur ex vivo und/oder in vivo Gentherapie.

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07H 1/08, C12N 15/10, A61K 48/00		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/29113
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. August 1997 (14.08.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00321		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 24. Januar 1997 (24.01.97)			
(30) Prioritätsdaten: 96101628.4 6. Februar 1996 (06.02.96) EP			
(34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw.			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE/DE); Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(72) Erfinder; und			
(73) Erfinder/Anmelder (nur für US): KUHNE, Wolfgang (DE/DE); Wolfbauerweg 10, D-82377 Penzberg (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Werk Penzberg, Patentabteilung (RE-TB), Postfach 11 52, D-82372 Penzberg (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 2. Oktober 1997 (02.10.97)	
(54) Title: PROCESS FOR PREPARING PURIFIED NUCLEIC ACID AND THE USE THEREOF			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON GEREINIGTER NUKLEINSÄURE UND DEREN VERWENDUNG			
(57) Abstract			
The invention relates to a nucleic acid preparation with a content of below 1 % protein, preferably below 0.1 % protein, free of ethidium bromide, phenol, caesium chloride and detergents based on octyl phenol poly(ethylene glycol ether) _n and with a content of below 1 EU/mg DNA of endotoxins. Said preparation is suitable as a drug particularly in gene therapy.			
(57) Zusammenfassung			
Eine Nukleinsäurepräparation mit einem Gehalt von weniger als 1 % Protein, vorzugsweise weniger als 0,1 % Protein, frei von Ethidiumbromid, Phenol, Cäsiumchlorid und Detergentien auf Basis von Octylphenolpoly(ethylenglycolether) _n sowie mit einem Gehalt von weniger als 1 EU/mg DNA an Endotoxinen ist als Arzneimittel insbesondere in der Gentherapie geeignet.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LU	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MD	Republik Moldau	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
EE	Estland	ML	Mali	UG	Uganda
ES	Spanien	MN	Mongolei	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MR	Mauretanien	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MW	Malawi	VN	Vietnam
GA	Gabon				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/EP 97/00321

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07H1/08 C12N15/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07H C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 21250 A (VICAL INCORPORATED) 10 August 1995 see page 31; claims; examples ---	1-10
A	EP 0 268 946 A (DIAGEN) 1 June 1988 cited in the application see the whole document ---	1-10
A	WO 95 21177 A (QIAGEN GMBH) 10 August 1995 cited in the application see claims; examples 4,5 ---	1-10
A	WO 95 21179 A (QIAGEN GMBH) 10 August 1995 see claims; examples -----	9

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 July 1997

Date of mailing of the international search report

12.08.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Day, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/00321

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9521250 A	10-08-95	US 5561064 A CA 2179603 A EP 0742820 A	01-10-96 10-08-95 20-11-96
EP 268946 A	01-06-88	DE 3639949 A DE 3787445 D DE 3787445 T JP 7013077 B JP 63150294 A US 5057426 A	09-06-88 21-10-93 07-07-94 15-02-95 22-06-88 15-10-91
WO 9521177 A	10-08-95	DE 4432654 A AU 1577695 A AU 1577795 A AU 1664695 A CA 2182388 A CA 2182397 A CA 2182398 A WO 9521178 A WO 9521179 A EP 0743948 A EP 0775150 A EP 0743949 A AU 1664795 A WO 9608500 A EP 0781291 A	21-03-96 21-08-95 21-08-95 21-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 27-11-96 28-05-97 27-11-96 29-03-96 21-03-96 02-07-97
WO 9521179 A	10-08-95	DE 4432654 A AU 1577695 A AU 1577795 A AU 1664695 A CA 2182388 A CA 2182397 A CA 2182398 A WO 9521177 A WO 9521178 A EP 0743948 A EP 0775150 A EP 0743949 A AU 1664795 A	21-03-96 21-08-95 21-08-95 21-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 27-11-96 28-05-97 27-11-96 29-03-96

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC 1/EP 97/00321

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9521179 A		WO 9608500 A EP 0781291 A	21-03-96 02-07-97

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1/EP 97/00321

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07H1/08 C12N15/10 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07H C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 21250 A (VICAL INCORPORATED) 10. August 1995 siehe Seite 31; Ansprüche; Beispiele	1-10
A	EP 0 268 946 A (DIAGEN) 1. Juni 1988 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-10
A	WO 95 21177 A (QIAGEN GMBH) 10. August 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche; Beispiele 4,5	1-10
A	WO 95 21179 A (QIAGEN GMBH) 10. August 1995 siehe Ansprüche; Beispiele	9

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Juli 1997

Abschließungsdatum des internationalen Recherchenberichts

12-08-1997

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Day, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCI/EP 97/00321

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9521250 A	10-08-95	US 5561064 A CA 2179603 A EP 0742820 A	01-10-96 10-08-95 20-11-96
EP 268946 A	01-06-88	DE 3639949 A DE 3787445 D DE 3787445 T JP 7013077 B JP 63150294 A US 5057426 A	09-06-88 21-10-93 07-07-94 15-02-95 22-06-88 15-10-91
WO 9521177 A	10-08-95	DE 4432654 A AU 1577695 A AU 1577795 A AU 1664695 A CA 2182388 A CA 2182397 A CA 2182398 A WO 9521178 A WO 9521179 A EP 0743948 A EP 0775150 A EP 0743949 A AU 1664795 A WO 9608500 A EP 0781291 A	21-03-96 21-08-95 21-08-95 21-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 27-11-96 28-05-97 27-11-96 29-03-96 21-03-96 02-07-97
WO 9521179 A	10-08-95	DE 4432654 A AU 1577695 A AU 1577795 A AU 1664695 A CA 2182388 A CA 2182397 A CA 2182398 A WO 9521177 A WO 9521178 A EP 0743948 A EP 0775150 A EP 0743949 A AU 1664795 A	21-03-96 21-08-95 21-08-95 21-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 10-08-95 27-11-96 28-05-97 27-11-96 29-03-96

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PC1/EP 97/00321

Portablatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)